Роль микробиологической лаборатории в реализации программы СКАТ

Д.А. Попов

Задачи лаборатории клинической микробиологии

- Идентификация возбудителей инфекций и определение их чувствительности к антибиотикам в максимально короткие сроки
- Микробиологический мониторинг
- Расшифровка механизмов резистентности
- Помощь лечащим врачам в интерпретации данных
- Оптимизация антимикробной терапии
- Санитарная бактериология исследования на стерильность, смывы

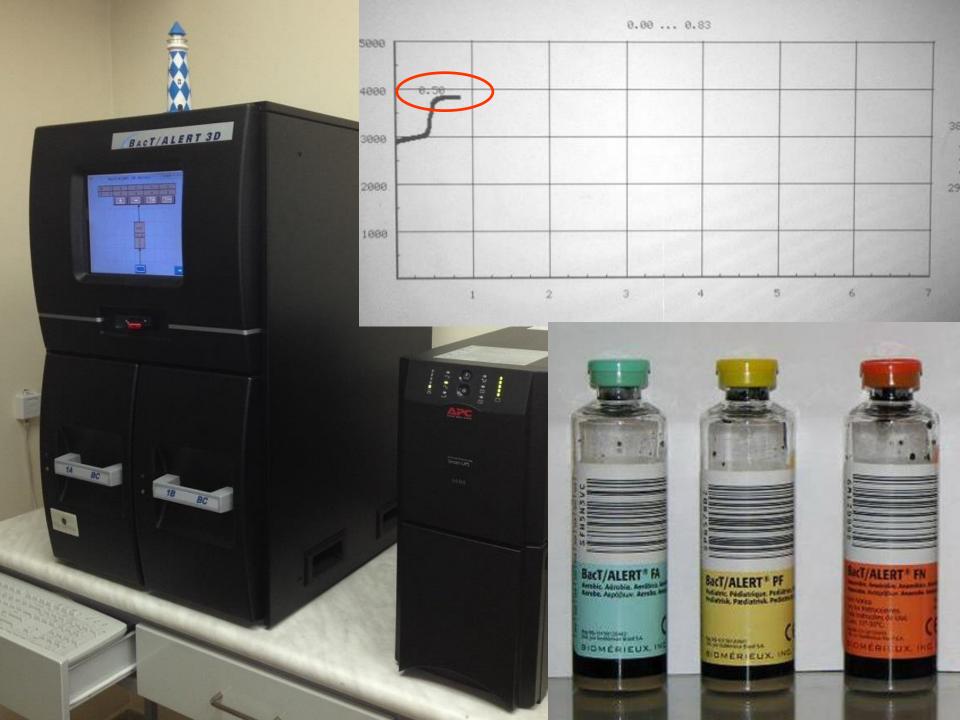
Этапы оптимизации

- Преаналитический
 - □ Показания к исследованию
 - Взятие материала
 - Доставка материала в лабораторию
- Аналитический
 - □ Оборудование
 - □ Расходные материалы
 - Лабораторные технологии
- Постаналитический
 - □ Интерпретация результатов

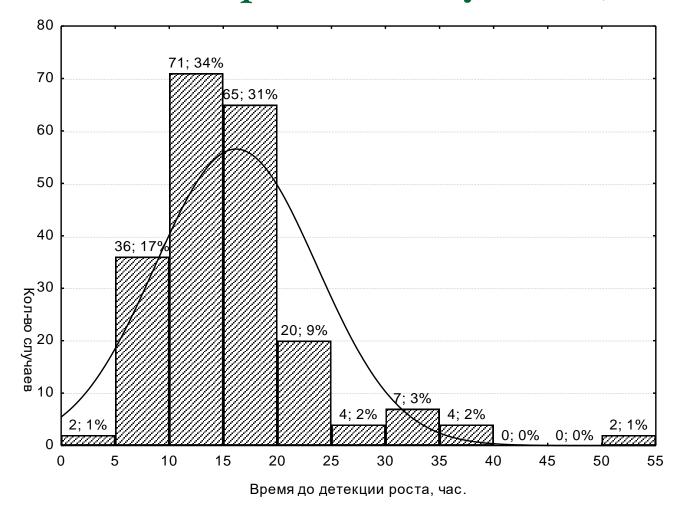


50 лет на одном месте...





Частота положительных результатов в зависимости от времени инкубации, n=211



Popov D. et al. ICAAC/ICC 2015, San-Diego, 17-21 Sep 2015, P220

Диагностика КАИК по методу дифференцированного роста





При КАИ обсемененность пробы крови, взятой из сосудистого катетера, выше по сравнению с полученной пункционно, что проявляется более быстрым ростом катетерной пробы (на 2-2,5 ч раньше).

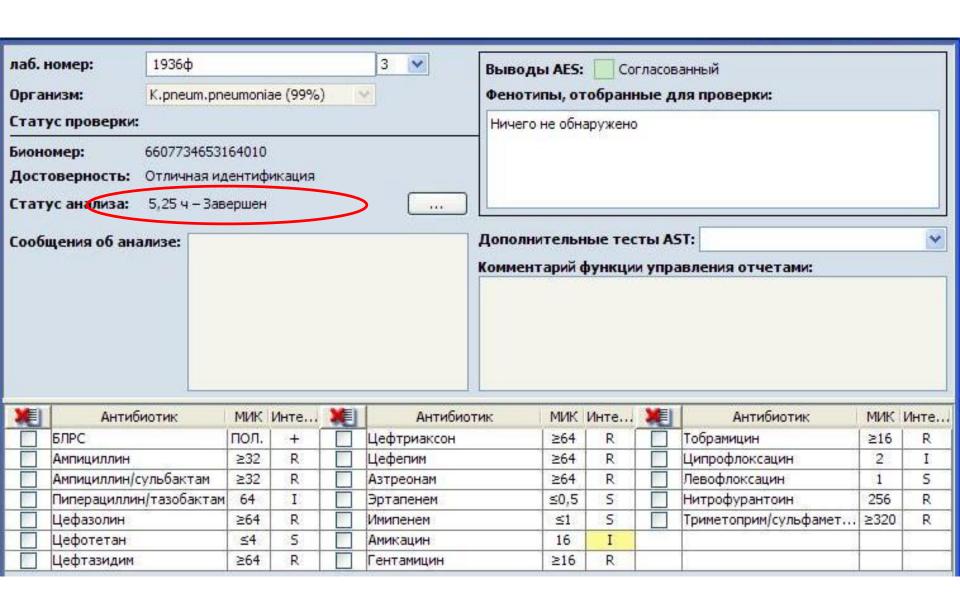
Методика позволяет избежать удаления катетера, когда он не является источником инфекции.

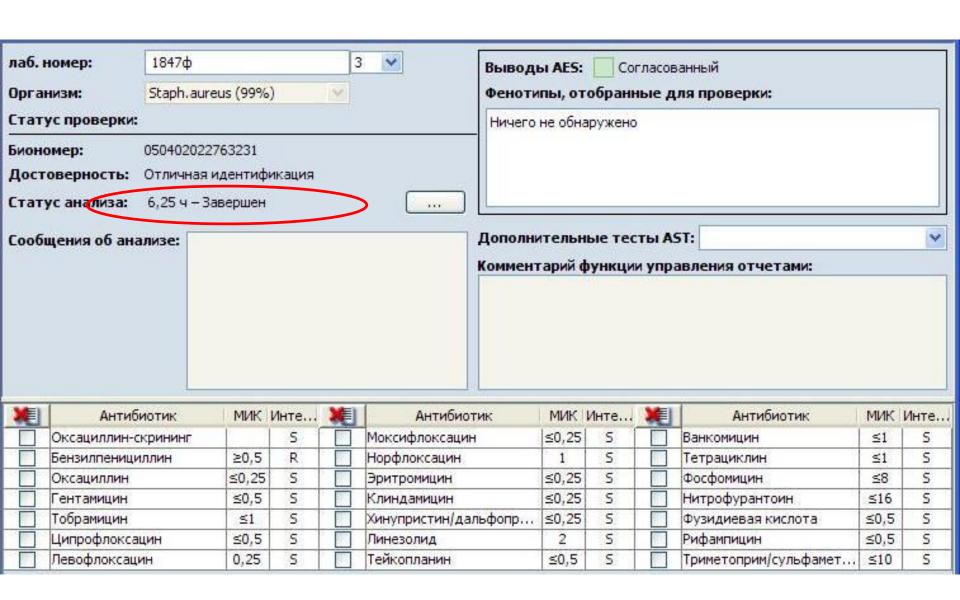
* - время регистрации роста



Микробиологический анализатор







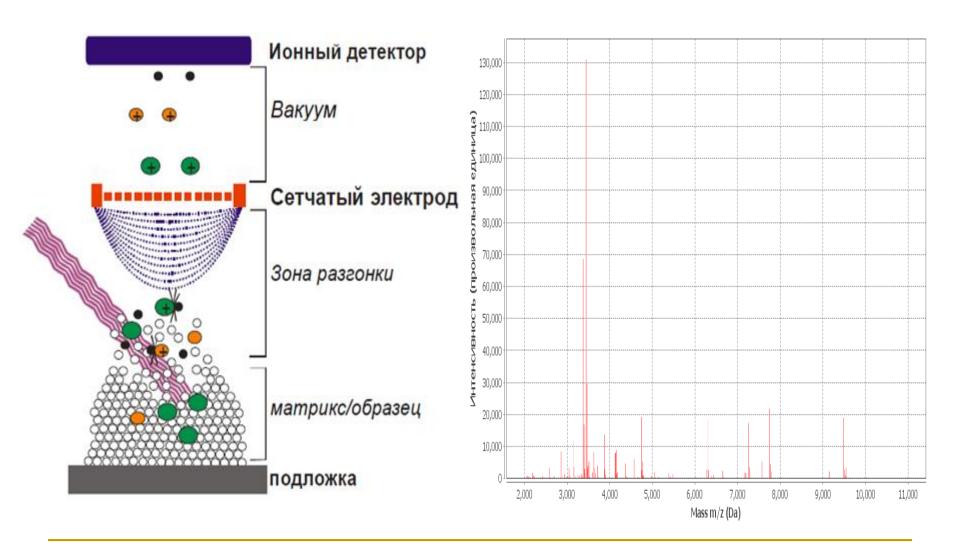
Как ускорить этиологический диагноз?

 Молекулярно-генетические методы диагностики (ПЦР, FISH-гибридизация и др.)

MALDI-ToF MS

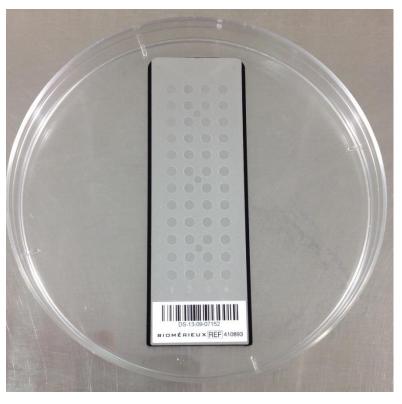
Магнитный резонанс

MALDI-ТоF масс-спектрометрия



Нанесение образцов и матрикса на слайд

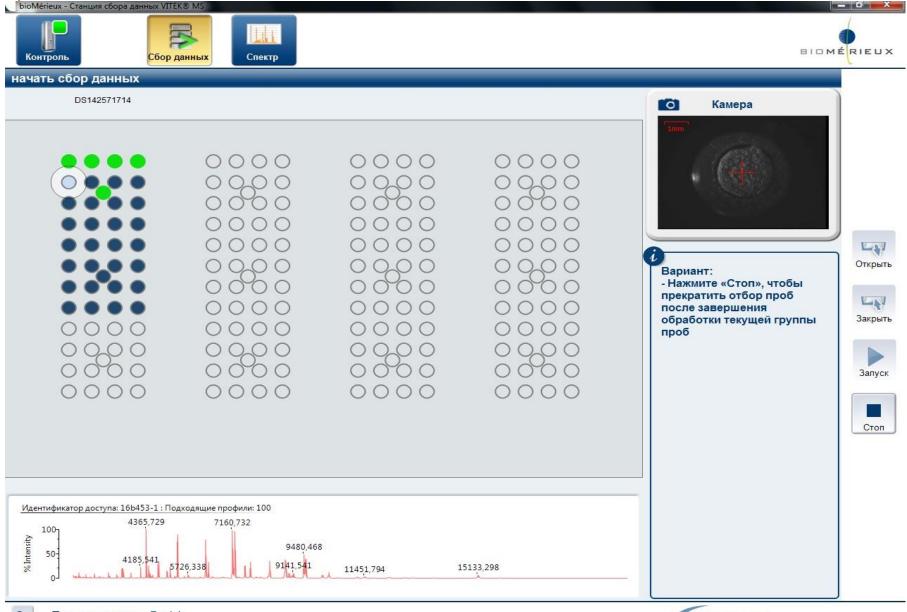
Ввод информации об образцах



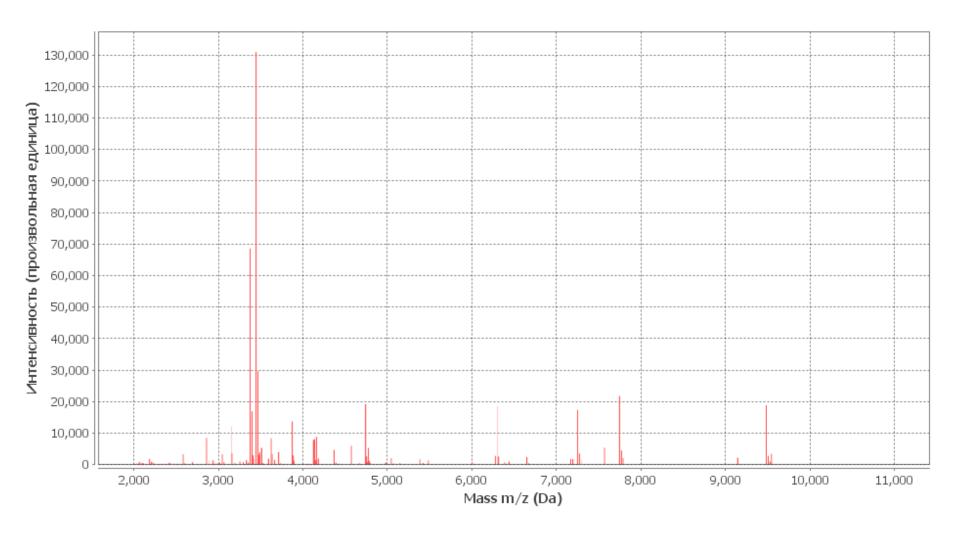


Емкость - 48 образцов

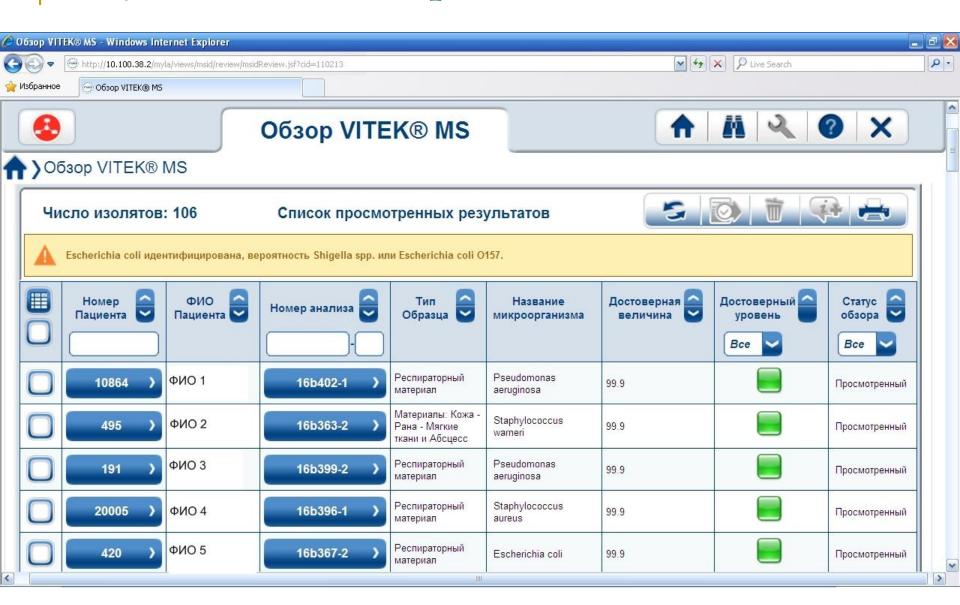
Считывание слайда



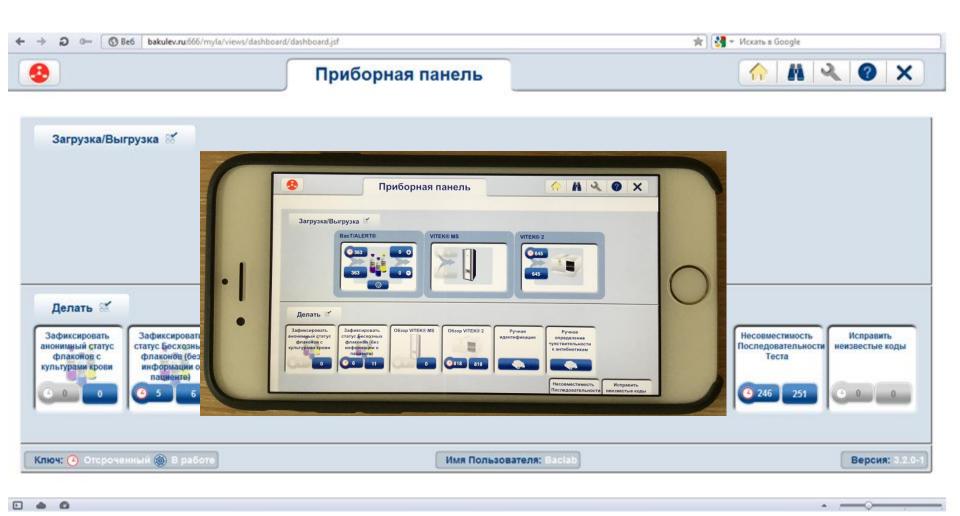
Масс-спектрограмма



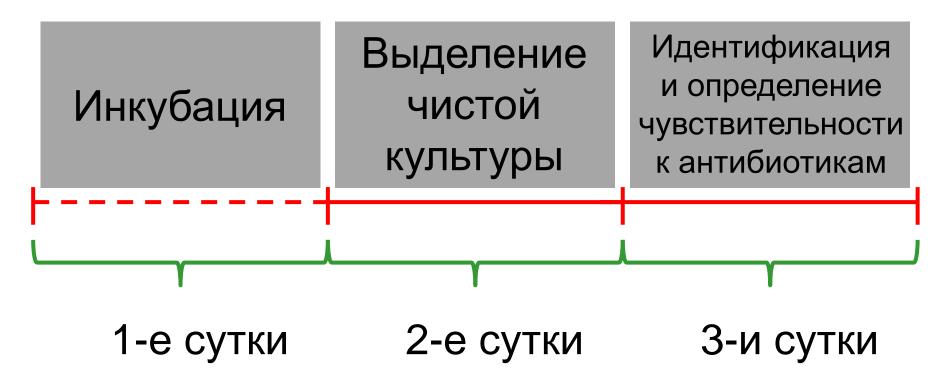
Результаты идентификации



Система интеграции данных Myla

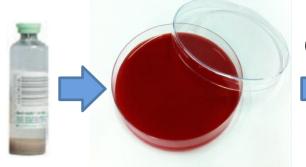


Рутинное исследование гемокультур



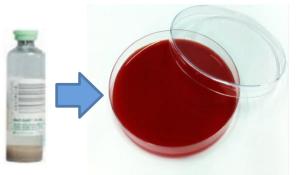
Как ускорить получение результата?

Способы ускорения идентификации гемокультур



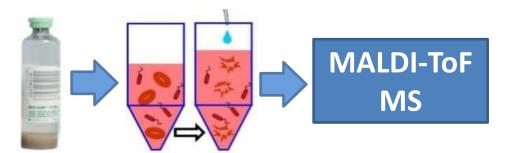
Стандартная инкубация: 16-18 ч

MALDI-ToF MS



Сокращенная инкубация: 2-6 ч

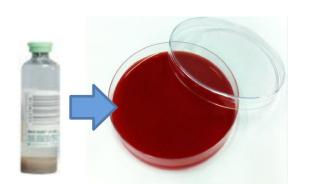
MALDI-ToF MS



Результаты экспресс-методов идентификации гемокультур с помощью MALDI-ToF MS

Источник	Метод	n	Успешная идентификация
Schmidt V. et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(3):311-7	Центрифугирование в пробирках с гелем	103	Грам (-): 93% (40/43) Грам (+): 75% (45/60)
Jo SJ et al. Ann Lab Med. 2016;36(2):117-23	Фильтрация	254	Грам (-): 92,6% Грам (+): 73,9%
Idelevich E. A. et al. Clin Microbiol Infect.	Сокращенная инкубация	165	Время — до 12 ч. Грам (-): 97,6% (41/42) Грам (+): 98,8% (85/86) Грибы: 20% (1/5)
2014;20(10):1001-6		165	Грам (-): 78,6% (33/42) Грам (+): 41,9% (36/86) Грибы: 20% (1/5)
Чеботарь И.В., Лазарева А.В. с соавт. Клин мед. 2015;2:68-74	Центрифугирование с экстракцией («домашний» метод)	120	Грам (-): 100% Грам (+): 92% Грибы: 100%

Способы ускорения идентификации гемокультур



Сокращенная инкубация: 2-6 ч

MALDI-ToF MS

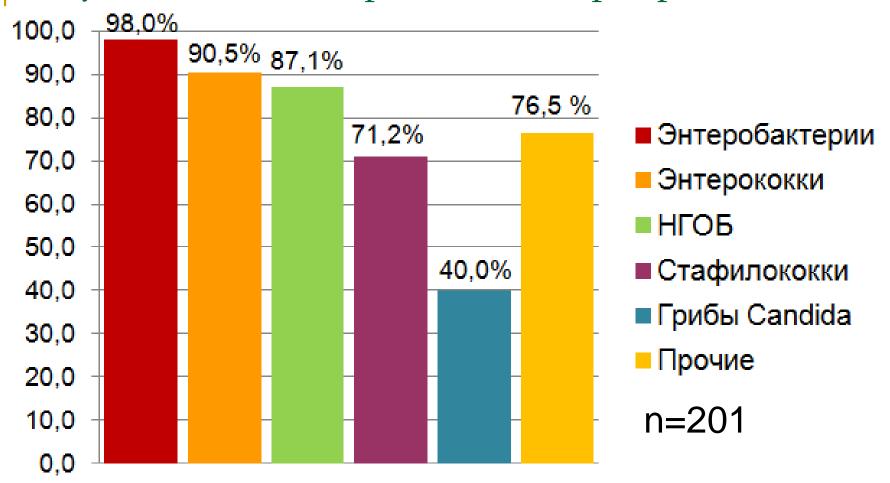
Исследовано 475 положительных монокомпонентных гемокультур

Микроорганизмы	Идентифицировано	Время инкубации
Грам (-)	144/147(98%)	2,7 (1,5-5,5)
неферментирующие	60/60 (100%)	2,9 (1,5-5)
энтеробактерии	84/87 (96,5%)	2,5 (1,5-5,5)
Грам (+)	277/294 (94%)	3,9 (3-6)
энтерококки	45/46 (98%)	3,7 (3-4,5)
стафилококки	211/227 (93%)	3,9 (3-6)
прочие	21/21 (100%)	4 (3-6)
Грибы	16/34 (47%)	5 (4-6)

Прямая идентификация гемокультур - этапы исследования

- Удаление крупнодисперсных частиц (сорбент)
- Лизис форменных элементов крови
- Отмывка осадка микроорганизмов
- Экстракция белков «домашнего хозяйства»
- Нанесение на мишень, добавление матрикса
- MALDI-ToF MS

Результаты идентификации микроорганизмов



Суммарная доля успешной прямой идентификации – 81,1% Время выполнения исследования – около 1 ч.

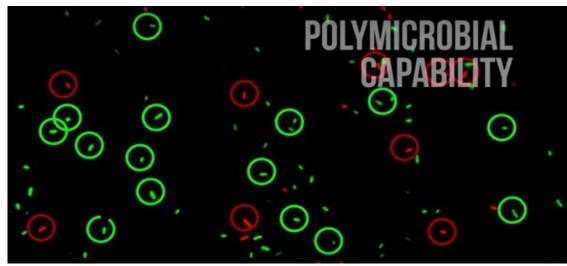
Новые методы «быстрой» микробиологии

- ID мультиплексная флюоресцентная гибридизации *in* situ (FISH)
- AST анализ микроскопических изображений, позволяющий отслеживать гибель микробных клеток в присутствии антибиотиков в режиме реального времени
- Валидирован для исследования положительной гемокультуры, прочие субстраты – в разработке





Новые методы «быстрой» микробиологии







- Результат
 идентификации
 возбудителя
 доступен в среднем
 через 1-1,5 ч
- Еще через 5 ч чувствительность к АБ
- Нижний предел детекции составляет 10⁴ КОЕ/мл

Новые методы «быстрой» микробиологии



следование цельной крови зец парамагнитных частиц, ении тех или иных телей

ования цельной крови для albicans, C. tropicalis, C.

 Выявление фунгемии в теч начала исследования.

Нижний предел детекции сос

Чувствительность – 96,4%, с



Карбапенемазы



Детекция карбапенемаз

	Значения эпидемиологической точки отсечения		
Антибиотик	Диаметр зоны ингибиции, мм	МПК, мкг/мл Enterobacteriaceae/P. aeruginosa	
Меропенем	26	0,125/0,25	
Дорипенем	27	0,125/0,5	
Имипенем	24	0,5/4,0	
Эртапенем	29	0,064/нет	

- Фенотипические методы
 - По ингибированию EDTA (MBL),
 аминофенилбороновой к-той (KPC)
 - □ Ходж-тест
 - Метод инактивации карбапенемов
 - Carba NР-тест
- Молекулярно-генетические методы (ПЦР)

Рекомендации по диагностике и лечению сепсиса

Intensive Care Med (2013) 39:165–228 DOI 10.1007/s00134-012-2769-8

GUIDELINES

R. P. Dellinger

Surviving Sepsis Campaign: International

TABLE 1. Diagnostic Criteria for Sepsis

Infection, documented or suspected, and some of the following:

General variables

Fever (> 38.3°C)

Hypothermia (core temperature < 36°C)

D. Antimicrobial Therapy

- Administration of effective intravenous antimicrobials within the first hour of recognition of septic shock (grade 1B) and severe sepsis without septic shock (grade 1C) as the goal of therapy.
- 2a. Initial empiric anti-infective therapy of one or more drugs that have activity against all likely pathogens (bacterial and/or fungal or viral) and that penetrate in adequate concentrations into tissues presumed to be the source of sepsis (grade 1B).
- 2b. Antimicrobial regimen should be reassessed daily for potential deescalation (grade 1B).
- Use of low procalcitonin levels or similar biomarkers to assist the clinician in the discontinuation of empiric antibiotics in patients who initially appeared septic, but have no subsequent evidence of infection (grade 2C).

Leukopenia (WBC count < 4000 µL⁻¹)

Normal WBC count with greater than 10% immature forms

Plasma C-reactive protein more than two sp above the normal value

Plasma procalcitonin more than two so above the normal value

Прокальцитонин

- Раннее распознавание
- Дифференциальная диагностика
- Объективный критерий для назначения заместительной иммунотерапии
- Прогнозирование послеоперационных инфекционных осложнений и летальности
- Своевременное начало антибиотикотерапии
- Оценка эффективности терапии
- Своевременная отмена антибиотиков

Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial

Evelien de Jong, Jos A van Oers, Albertus Beishuizen, Piet Vos, Wytze J Vermeijden, Lenneke E Haas, Bert G Loef, Tom Dormans, Gertrude C van Melsen, Yvette C Kluiters, Hans Kemperman, Maarten J van den Elsen, Jeroen A Schouten, Jörn O Streefkerk, Hans G Krabbe, Hans Kieft, Georg H Kluge, Veerle C van Dam, Joost van Pelt, Laura Bormans, Martine Bokelman Otten, Auke C Reidinga, Henrik Endeman, Jos W Twisk, Ewoudt M W van de Garde, Anne Marie G A de Smet, Jozef Kesecioglu, Armand R Girbes, Maarten W Nijsten, Dylan W de Lange

- Проспективное многоцентровое рандомизированное открытое исследование (15 стационаров в Нидерландах) – SAPS
- Пациенты старше 18 лет в ОРИТ, получившие первую дозу АБ не ранее 24 ч с момента включения в исследование
- 4507 пациентов скринировано, 1575 рандомизировано

Исследование SAPS

- Не включены больные:
 - □ Не давшие информированного согласия
 - С ожидаемой длительностью пребывания в ОРИТ менее 48 ч
 - Получавшие АБ >24 ч к моменту скрининга
 - Получавшие АБ с целью АБП
 - Нуждающиеся в длительной АБТ
 - □ Инфекции небактериальной этиологии
 - Находящиеся в тяжелой иммуносупрессии
 - □ Инкурабельные

Исследование SAPS

- Исследуемая группа (n=538) тактика отмены антибиотиков с учетом результатов теста ПКТ
 - Снижение уровня ПКТ на 80% и более от пикового уровня
 - ПКТ≤0,5 нг/мл
- Группа сравнения (n=457) стандартная тактика отмены антибиотиков

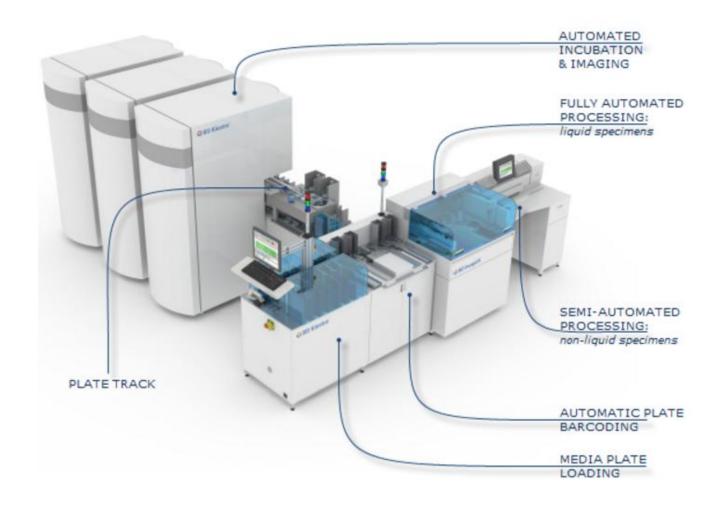
Исследование SAPS

Показатель	Группа с ПКТ (n=761)	Группа сравнения (n=785)	p
Длительность АБТ, дней	5 (3-9)	7 (4-11)	<0,0001
Потребление АБ, DDD	7,5 (4-12,8)	9,3 (5-16,5)	<0,0001
Средняя стоимость АБ на пациента, евро	107 (51-229)	129 (66-273)	0,0006
Повторные курсы АБ, %	23	22	0,67
28-дн. летальность, %	19,6	25	0,0122
Летальность в течение года, %	34,8	40,9	0,0158

Оборудование

- Автоматические инкубаторы гемокультур
- Микробиологические анализаторы
- Автоматические приборы для приготовления и розлива питательных сред
- Системы для автоматической окраски клинических образцов по Граму
- Системы для автоматического рассева клинических образцов на чашки Петри
- **...**

Автоматизация микробиологических исследований



Оптимальный баланс между мощностью лаборатории и потребностями клиники

Близость к пациенту — более быстрое получение результата

Централизация — более эффективное использование оборудования



Пути совершенствования

- Оснащение лаборатории современным оборудованием, использование качественных расходных материалов
- Внедрение компьютерных технологий, удаленный доступ
- Обучение персонала
- Сведение к минимуму потока малоинформативных исследований
- Программы контроля качества
- Активное сотрудничество с клиницистами ранняя микробиологическая диагностика не всегда ускоряет назначение или коррекцию терапии!